

微古生物学の情報基盤の活用事例：共生藻類の有無と放散虫の高次分類

辻 彰洋*・鈴木紀毅**

*国立科学博物館植物研究部・**東北大学大学院理学研究科地学専攻

Symbiosis on radiolarians based on the updated taxonomy

Akihiro Tuji* and Noritoshi Suzuki**

*Department of Botany, National Museum of Nature and Sciences, Amakubo 4-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan (tuji@kahaku.go.jp);

**Department of Earth Sciences, Graduate School of Science, Tohoku University, 6-3 Aramaki Aoba, Aoba-ku, Sendai City, Miyagi, 980-8578 Japan.

Abstract. This paper first briefly explains the term “symbiosis”, whose definition is variable when talking about the interaction between hosts and their associated organisms, and shows the difficulty to determine their real interactions in the radiolarian studies. The practical recognition of algal symbionts in radiolarians is largely relied on the confirmation of fresh chloroplasts and nuclei in the coccoid form algae. Algal symbionts are apparently present in particular radiolarian species, but this has not been discussed in detail so far. Prior to the discussion, we updated the radiolarian taxonomic names registered in GenBank, because the information in this gene database has rarely been updated once it was recorded. The updated taxonomic names were then applied for the molecular phylogenetic analyses, resulting that the symbiont-bearing radiolarians were found in some specified clades in the phylogenetic trees. As this test shows, the taxonomic names in GenBank should be updated for their own use.

Key words: Gene bank, phylogeny, Radiolaria, symbiont, taxonomy, Zoochlorella, Zooxanthella

はじめに

放散虫を研究対象とする魅力のひとつは、現生種の遺伝子解析と化石記録を組み合わせた研究に適していることである (Suzuki and Not, 2015)。放散虫やフェオダリア類、ならびに放散虫の共生生物の分子系統解析は日本人による研究で進展し (e.g., Yuasa *et al.*, 2005; Kunitomo *et al.*, 2006; Ishitani *et al.*, 2012; Nakamura *et al.*, 2015a), 放散虫の共生生物についても遺伝子解析から分類群の特定やその生態・環境的意義について論じられるようになってきた (Dolven *et al.*, 2007; Decelle *et al.*, 2012a, b, 2013; Probert *et al.*, 2014)。共生藻に関しては放散虫にとどまらず、浮遊性原生生物まで包括的に遺伝子解析の対象となっている (Decelle *et al.*, 2015)。このような研究の進展と平行して分子系統解析結果と形態分類との対応づけも行われた (Decelle *et al.*, 2012c; Ishitani *et al.*, 2012, Biard *et al.*, 2015; Nakamura *et al.*, 2015a)。第四紀放散虫についてこの対応を反映させ、種から超科にかけて形態分類体系が更新された (Matsuzaki *et al.*, 2015)。これらの一連の研究によって、現生放散虫はアカンタリア目 (Acantharia), コロダリア目 (Collodaria), ナセラリア目 (Nassellaria), タクソポディア目 (Taxopodia), スプメラリア目 (Spumellaria) が分子系統解析から実在することが確かめられた (Suzuki and Not, 2015)。これらの

うち化石に残るのはコロダリア目, ナセラリア目, スプメラリア目である。これらはオパール質の骨格をもつポリキスティナ (Polycystina) あるいはポリキスティン放散虫 (Polycystinea) と呼ばれる。ポリキスティン放散虫の高次分類はまだ統一見解に至っていないが, Petrushevskaya (1967) や De Wever *et al.* (2001) が整理した科・超科体系を, 分子系統解析と対照した結果, コロダリア目は3科, ナセラリア目は5超科, スプメラリア目は8超科に整理されつつある (Biard *et al.*, 2015; Matsuzaki *et al.*, 2015; Suzuki and Not, 2015)。このような分類体系の更新によって, 分子生物学のこれまでの成果をより精緻に説明出来るようになった。

本稿が掲載される特集号「微古生物学の情報基盤とその活用」では、「コンテナ」を単位とするデータベース化 (木原ほか, 2016) と, 標本の分類名を随時更新するシノニムデータベース (鈴木, 2016) による情報基盤の整備が論じられてきた。本稿はその活用にあたる。遺伝子データのデータバンクであるジーンバンク (GenBank) には, 誰でもデータを登録でき, 分類名は同定の是非を問うことなく登録者が入力したものがそのまま掲載される。研究が進展し誤同定が明らかになった場合でも, 分類名の修正は登録者による修正登録が必要であり放置されることが多い。更新が稀という観点でいえば, これは木原ほか (2016) のいう一種の「コンテナ」といえよう。しか

し、「コンテナ」を利用する場合は現行の分類体系での読み直しが必要でない。本稿では、微古生物学の情報基盤を活用した一例として、放散虫の共生藻類を取り上げる。本稿では読者の便をはかるため、共生や寄生という用語と、水域における共生藻類と物質循環についてまずは簡潔に説明する。そのうえで、放散虫で共生藻類と呼ばれている生物の認定の実体について整理する。宿主（宿主）である放散虫について更新された形態分類体系を使うとジーンバンクの放散虫データをどのように活用でき、そして彼らと共生藻類との関係がどのように見えてくるかについて述べてゆきたい。

生物相互作用

地球上の生物は単独で生きているのではなく、関係性を持って生きている。関係性としては、食物連鎖における食う食われるの関係が最もよく知られているが、それ以外にも多くの種間関係が存在する。本報で取り上げる共生もその一つである。ここで「共生」という言葉について確認しておきたい。共生の用語は心地よいニュアンスが存在するため、人間社会でも幅広く用いられるようになったが、本来は生態学の用語である。複数の種が影響を及ぼし合って生息している関係性が存在する場合、広い意味での共生と呼ばれる。この共生の中には互いにとってメリットが認められる相利共生（狭義の意味での共生）と、一方が利益を得て片方が被害を受ける寄生が知られている。しかし近年の生態研究により、実際の種間関係は両極端なものではなく、寄生関係にあったものが進化の過程で共生に近づくなど、様々な中間段階が存在することが明らかになった。それらの中間段階は偏利共生と呼ばれる（共生に関しては石橋・名和 [2008] ほか多数の邦文書を参考にされたい）。水界に生息する生物の中で、光合成を行う藻類と、動物が共生している例がよく知られている。有名な例はサンゴの仲間に共生する褐虫藻（渦鞭毛藻）で、水温が気象条件により高温になると、褐虫藻が逃げ出しサンゴの白化現象が生じる。また、生物の教科書に共生の例として良く取り上げられるミドリゾウリムシは、繊毛虫のゾウリムシにクロレラの仲間が共生したものである（たとえば石田, 2007）。

動物は有機物（炭素）を捕食により獲得する。一方、一次生産者である藻類は、光合成により有機物を自分で作り出すことが出来る。そのため、炭素の循環だけを考えるならば、両者の共生は成立しない。共生藻類を持つ生物は貧栄養水域に多く見られる。そのことから無機態の栄養塩類（特に窒素）が宿主である動物と共生藻類にとって重要な役割を果たしていることが分かる。Muscatine *et al.* (1984) は、炭素の放射性同位体 (^{14}C) でラベルした無機炭素を用いて、共生藻類による光合成産物（有機物）が宿主（サンゴ：*Stylophora pistillata*）

によって利用されることを明らかにした。また窒素はたとえばUhle (1999) は、安定同位体でラベルされた窒素が宿主（有孔虫：*Orbulina universa*）と共生藻類の間でリサイクルされることを実験によって明らかにした。このように、共生関係にあることを証明するには、宿主との物質のやり取りまで分かることが本質的には必要である。

放散虫の共生藻類研究の現状

放散虫の共生藻類についての関心は、共生藻類の分類的位置づけ、共生藻類と宿主との生物相互作用、共生藻類の種類と宿主の進化系統との関係、そして共生藻類が親から子に受け継がれる直接伝播なのか宿主の再生産後に独自に共生藻類を獲得する水平伝播なのか、などがあげられる（湯浅, 2012; 大金, 2013）。放散虫の共生藻類については近年Decelle *et al.* (2015) によってまとめられた。本報では、放散虫の共生藻類に関心をもった微化石研究者が直面するであろう問題についてまとめてみる。

命名上の問題

放散虫の共生藻類は、一般名詞「zooxanthella」の語源であり、海洋性原生生物の共生藻研究において歴史的な意味を持つ。単細胞生物の細胞内に藻類が共生する現象は古くから知られており、緑色の共生藻をゾークロレラ (*Zoochlorella*)、黄色の共生藻をゾーザンテラ (*Zooxanthella*: 褐虫藻) と呼んでいる。ゾーザンテラは、放散虫 (*Collozoum inerme*: コロダリア目) の細胞内の共生藻類（渦鞭毛藻類）を *Zooxanthella nutricula* として記載した (Brandt, 1881a) のが最初である。一方のゾークロレラの方は、同じ論文 (Brandt, 1881a) にて *Zoochlorella conductis* をタイプとする属名 *Zoochlorella* として記載されたものである。また同じ研究者がヒドラ・海綿・ゾウリムシ・ラップムシなどの細胞内の共生藻類を対象に詳述している (Brandt, 1881b)。OED (2009) によると、学名として使われていたラテン語「*Zooxanthella*」は、1889年に出版された「The Century Dictionary and Cyclopaedia」という辞書兼百科事典で英単語「zooxanthella」として掲載されて以降、この単語は「黄褐色の単細胞生物の一種で、放散虫やサンゴ、ほかの無脊椎動物の細胞内におり、おそらくは共生生物である」との語義で一般名詞となった。日本の生物学辞典「東京化学同人 生物学辞典」(2010) などの専門的辞書や、日本の英和辞典「ジーニアス英和大辞典」や「ランダムハウス英語辞典」は、生物学や動物学の専門用語としながらも、OED (2009) とほぼ同じ語義で「褐虫藻」として「zooxanthella」を掲載している。この学名の普通名詞化と一般的普及は、分類学上も専門用語上も混乱を引き起

こしている。たとえば「岩波 生物学辞典」では第4版(1996)で「褐虫藻」の項目はあったが、第5版(2013)では消え、そのかわり「共生藻」の項目の中に「黄褐色のものは褐虫藻…と総称されることがある」と扱いに変化が認められる。このような混乱もあり、属名としてのゾーザンテラ (*Zooxanthella*) についてBlank and Trench (1986) が廃棄名とすることを提案した。しかし、提案の技術的問題もあり国際植物命名規約に関する委員会によって承認されなかった (Silva, 1994)。Probert *et al.* (2014) は、将来国際藻類・菌類・植物命名規約 (ICN) の藻類委員会に *Zooxanthella* 属の廃棄名を提案する事を前提とした上で、*Z. nutricula* Brandt をタイプとして *Brandtodinium* 属を設立した。しかし、*Zooxanthella* 属の廃棄名が新たに提案され承認・発効されるまでこの *Brandtodinium* 属は *Zooxanthella* 属のシノニムで命名規約上の非合法名である。

似たような問題は「*Zoochlorella*」と「*Chlorella*」の間にも起きていたがこちらは解決している。Silva (1999) は、*Zoochlorella* 属の実体が1890年に提唱されたクロレラ属 (*Chlorella*) と同一であり、国際植物命名規約 (当時。現在は国際藻類・菌類・植物命名規約) 上は *Zoochlorella* が先取権を持つが、一般にはクロレラ属の学名が幅広く用いられていて、修正することで混乱が引き起こされることから、*Zoochlorella* を廃棄名、*Chlorella* を保存名とすることを提案した。この提案は同規約の藻類委員会で承認され (Compère, 1999) 総会で承認されたことで、国際植物命名規約 (セントルイス規約: Greuter *et al.*, 2000) で発効した。これは現在の国際藻類・菌類・植物命名規約 (ICN) でも引き続き有効である。この措置により、ゾークロレラ (*Zoochlorella*) は学名の属名としては無効であるが、動物に共生する緑藻としての通称名としては引き続き使われ続けていることになった。このような解決が“*Zooxanthella*”でも求められていることを指摘したい。

共生関係の認定とその問題点

共生の関係を具体的に把握するには、ホストとホストに付随する生物が物質をやり取りしていることを明らかにする必要がある。ホストの放散虫と共生藻類がどのような物質をやりとりしているかについては、コロダリア目に属する数mm単位の大型単独種と群体性種を対象として、放射性同位体を用いて研究された (Anderson *et al.*, 1985)。その結果、¹⁴Cでラベルされた炭酸が共生藻類によって同化され、その光合成産物がホストに移行することがわかった。このような操作実験は、コロダリア目のように巨大群体を形成する種か、単独でも直径数mmの大型個体となる種が存在する場合は適している。しかし、放散虫のほとんどは大きさが数百ミクロン径で生活は単独で、また培養が困難なため、コロダリア目以外

での実験成功例は報告されていない。さらに近年は放射性同位体を用いた実験系に厳しい制限があるため追試もほとんど行われておらず、ホストと共生藻類の炭素のやり取りをもって物質のやり取りがあると証明することは現実的に不可能である。

共生藻類の観察と認定

共生藻類の認定の出発点は、生きている放散虫個体に付随している藻類を見つけることである。共生藻類はホストの細胞内ではコッコイド・フォーム (coccoid form) と呼ばれる球形をしており、通常の透過型の光学顕微鏡下で黄褐色の大きさの揃った粒として観察できる (図1)。しかし、放散虫に付随する藻類は、共生藻類、放散虫に捕食された藻類、放散虫表面の粘質に捕縛された藻類がありえる。さらにホストの細胞内にはほかにもオルガネラの様な粒子状の構造が観察される。藻類の葉緑体に含まれるクロロフィルに蛍光顕微鏡下で430~450nmの青色励起光 (B励起) や320~380nmの紫外線励起光 (UV励起) を照射すると685nmに最大蛍光強度をもつ赤色自家蛍光 (「クロロフィル蛍光」という) を放つので (Rost, 1995)、放散虫でも付随する藻類を識別する方法として一般的に使われている (Takahashi *et al.*, 2003; Matsuoka, 2007; Ogane *et al.*, 2010)。ただし捕食された藻類もクロロフィル蛍光を発するため、放散虫によって消化されていないことや死骸でないことを確認する必要がある。そのために葉緑体の形が整っていることを確認し、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) と呼ばれる蛍光色素を使った染色で共生藻類核の確認を併用する必要がある (Suzuki *et al.*, 2009)。これに加え、INT フォルマザン (1-(4-Iodophenyl)-5-(4-nitrophenyl)-3-phenylformazan) による呼吸活性などの測定により、共生藻類を含む共生体の存在を確認する方法も検討するべきであろう。ここでの検出方法は、活性のある単細胞藻類が細胞内に存在することの確認であって、物質のやり取りや何らかの相互作用を確認する厳密な意味での共生関係の確認ではない。先に述べたように厳密な共生関係の確認は技術的に困難であり、現状では細胞内に存在することで何らかの共生関係を持っていると推定せざるを得ない。

共生藻類の同定とコンタミ問題

先述のように、共生藻類はホストの細胞内ではそのほとんどがコッコイド・フォームという球状の形態をとるために、形態観察によって同定することは出来ない (Falkowski and Knoll, 2007)。同定するためには共生藻類をホストから抜き出し、培養することで本来の形態に戻し、形態観察を行うことが必要である。あるいは、近年の分子生物学的手法を用いてコッコイド・フォームの共生体の分子同定を行う事で分類群を推定する事も可能である (Probert *et al.*, 2014)。共生藻類の同定について

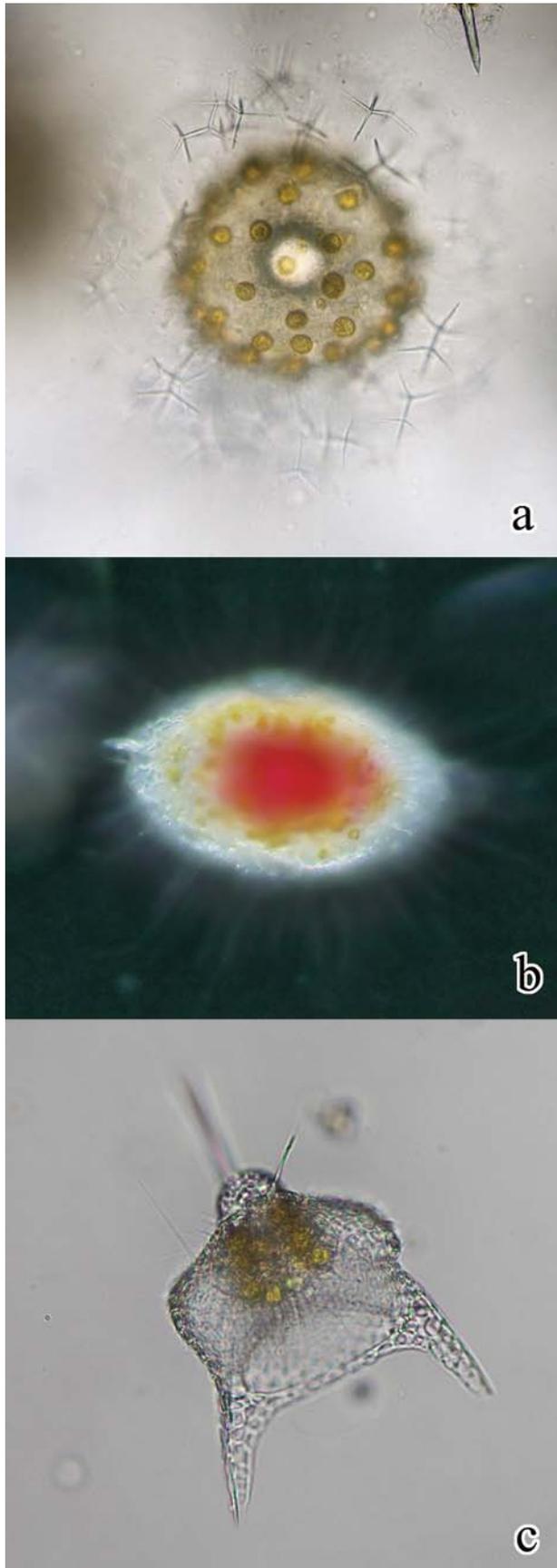


図1. 放散虫と共生藻類 (写真の縮尺は不統一). (a) コロダリア目 (群体の中の1個虫を拡大した写真), (b) スプメラリア目, (c) ナセラリア目. 黄褐色の球状の粒子が共生藻類. Probert *et al.* (2014) によれば, これらは "*Brandtonidium" nutricula* という渦鞭毛藻類の単一種からなる. 図1bの赤色部分は特定されていない色素.

は現在進行形であり, 様々な研究グループが取り組んでいる最中である.

培養法においても分子同定においても, 共生藻類の同定にあたってもっとも大きな問題がコンタミである. 放散虫はプランクトンネットで海水を濾過濃縮して採集するが, その過程で放散虫の表面には様々な生物が付着する (松岡, 2002). 放散虫の表面には粘着性の物質があるようで, スプメラリア目の表面にはカイアシ類のノープリウス幼生までもが付着する. また, プランクトンネット内や濾過濃集されたプランクトンが入っている試料瓶内ですぶれたカイアシ類の体液が放散虫に付着するため, 単純に放散虫を単離しただけでは, 放散虫の分子同定をはずなのにカイアシ類の遺伝子が検出されることも多い. これらのコンタミを避けるために, 採集後に濾過滅菌海水で1日程度培養することや, 遺伝子抽出前に緩衝液で良く洗うなどの処理によりコンタミを減らす努力をする. しかし厳密に考えれば検出された藻類の遺伝子がコンタミでないことの証明は極めて難しい. 得られた結果が本当に細胞内に共生していたものであるかどうかを他の方法を併用し, 確認する必要がある. このような研究においては, 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH法) という分子生物学では良く知られた手法によって, 得られた共生藻類の遺伝子データを用いてその遺伝子データを持つ藻類がホストの細胞内に存在していることを証明していく必要があると考えられる. しかしそのためには対象となるホストの放散虫について同一種を多数採取し, 実験条件の検討を行う必要があり, 現実的には難しい.

ジーンバンク利用の問題点

ホストである放散虫も共生生物も遺伝子データを論文で扱う場合はジーンバンクに登録し, その番号を論文に明記する. その蓄積によって後世の研究者が遺伝子データを再利用して研究を深めていく. このジーンバンクは正体不明の生物を分子同定するためにも普通に使われている. 簡便に誰でもジーンバンクを利用出来る反面, かって議論を混乱させることもある. 一般にジーンバンクと呼ばれる国際塩基配列データベースの日本拠点 DDBJ (DNA Data Bank of Japan) や米国拠点 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 等では登録に際して登録形式についての確認のみで, 同定と確からしさに関するチェックは行わない. また, 同定を確認するための標本の登録や標本番号の記載も必要とされていない. そのため, ジーンバンクのデータベースには誤同定が多く含まれることは否めない. 著者の一人の辻

はシアノバクテリアも研究しているが、分類に長ける研究者だけではなくシアノバクテリアの遺伝子を使う応用分野の研究者人口も多く、分類名が怪しい多くの遺伝子情報がジーンバンクへ登録されている。例えば形態的な類似種が多く誤同定の多いシアノバクテリアの *Dolichospermum spiroides* (Klebahn) Wacklin *et al.* (= *Anabaena spiroides*) をジーンバンクで検索すると42もの16S rRNA関連のエントリーがあるが、それらのエントリー中には遺伝子的に明らかに別属と考えられるものが多数含まれている。分類を確かめるすべがないことから、*Dolichospermum*属および関連属の系統関係の解析にあたっては、自分たちのデータだけに限って解析を行うしかなかった (Tuji and Niiyama, 2010, 2012)。

この様なジーンバンクの同定に関する問題を解決する試みも行われている。近年では古典的な分類学で行われてきた博物館標本と関連付けた (博物館の標本番号を情報として記入した) 遺伝子登録が分類研究者の中で行われるようになってきた。ドイツのAlga Terraプロジェクト (<http://www.algaterra.org>) では、ホームページ上で遺伝子登録された標本の写真を公開している。扱いたい分類群の質を保証して遺伝子データを使いたい場合、標本を確認できる登録情報のみを解析する事が分類学的には重要である。正体不明の生物を遺伝子データから突き止める場合、現行の分類体系に更新された情報なしには大変危険である。

遺伝子データを得る場合には分析に必要な遺伝子量を稼ぐ必要があるのだが、微小生物は遺伝子量が少ないため、その分析にはしばしば困難がともなう。珪藻のような独立栄養性単細胞原生生物やシアノバクテリアなどでは培養できるものも少なくないことから、一細胞からのクローン培養によって同一遺伝子をもつと考えられるクローン株を遺伝子解析できる。一方、従属栄養性の単細胞原生生物では培養の難しい種が多い。これが放散虫などの遺伝子解析における問題の一つであった。同じ種を集めてまとめて解析すれば良いと思うかも知れないが、そこに誤同定が紛れている可能性を否定できないし、そもそも遺伝子の個体差などの影響で雑音が増えるので、この方法で解析することはまずない。そこで、フィールドより採集した一細胞からDNAを抽出増幅する単細胞PCR (Single cell Polymerase Chain Reaction) が行われることが多い。放散虫やフェオダリアではこの手法が一般的で、大形の個体では単細胞PCRを行った殻の一部を標本として保存することが可能である (Nakamura *et al.*, 2015b)。遺伝子抽出過程で標本を粉碎したり溶解させたりすることもあるので、その場合はピックアップした細胞を抽出前に写真撮影することで標本の代わりにできる。それらの証拠写真を遺伝子データベースの一部として取り込む必要がある。

更新された形態分類体系に基づくホストと共生藻類の関係

これまで述べてきたように、放散虫の「共生藻類」とされているものは厳密な意味で問題を抱えているものの、現生放散虫を扱った研究者の間では生きている放散虫を丹念に観察した経験があれば共生しているとみなしてまず間違い無いただろうという見解が一般的である。一方、放散虫には共生藻類が居る種と居ない種がいる。そのような共生藻類の有無とホストの系統関係とはどのようになっているのであろうか。進化戦略として放散虫が共生藻類を獲得する重要性は指摘されているが (たとえば湯浅, 2012)、系統分類体系との関係に着目して議論はあまりされていない。そこで、放散虫の形態分類を最新体系に読み直してレビューする。

進化過程における共生藻類の獲得のタイミング

放散虫の進化過程において共生藻類がいつ獲得されたのかを確認するために、放散虫の系統関係と共生藻類の有無について調べてみた。放散虫の系統関係はリボソームの小サブユニットをコードするDNA領域 (18S rRNA: DNAにコードされているのでrDNAとすることもある) に着目し、過去に調べられた遺伝子情報が網羅されているジーンバンクを用いた。リボソームはすべての真核生物がもつオルガネラなので、18S rRNAは真核生物の分子系統解析で最もよく用いられている分子種である。ジーンバンクにはポリキスティン放散虫の配列は調査時点 (2012年5月) で208配列が登録されている。しかし91配列は海水中の環境DNA由来で、種名を伴うのは117配列であった。そのうち、79配列が18S rRNAに関するものであった。ちなみに大半の49配列は日本人が登録したものであり、日本が放散虫の遺伝子解析で世界の先端を行っていることが分かる。また、これらの遺伝子解析研究を行った人たちのバックグラウンドが古生物にあったことも特筆すべき事である。この79配列を元にベイズ法により作成した系統樹が図2~4である。系統樹をより正確なものにするために、一部の学名については公表されている論文の写真をもとに学名を更新している。また、同一種に複数の配列が登録されている場合は一つの配列で代表させた。近年の分子系統解析では、より確実な解析を行うため複数の分子種を統合した解析がなされるようになってきた (Tuji *et al.*, 2014)。しかし、放散虫の分子系系統解析では18S rRNA以外の分子種の情報蓄積が十分でないため、本報では18S rRNAのみによる解析結果を示す。

図2はポリキスティン放散虫の目単位の系統関係を示している。現生種が確認されているポリキスティン放散虫の目レベルは1984年時点でコロダリア目、スプメラリア目、ナセラリア目の3目である (Petrushevskaya, 1984;

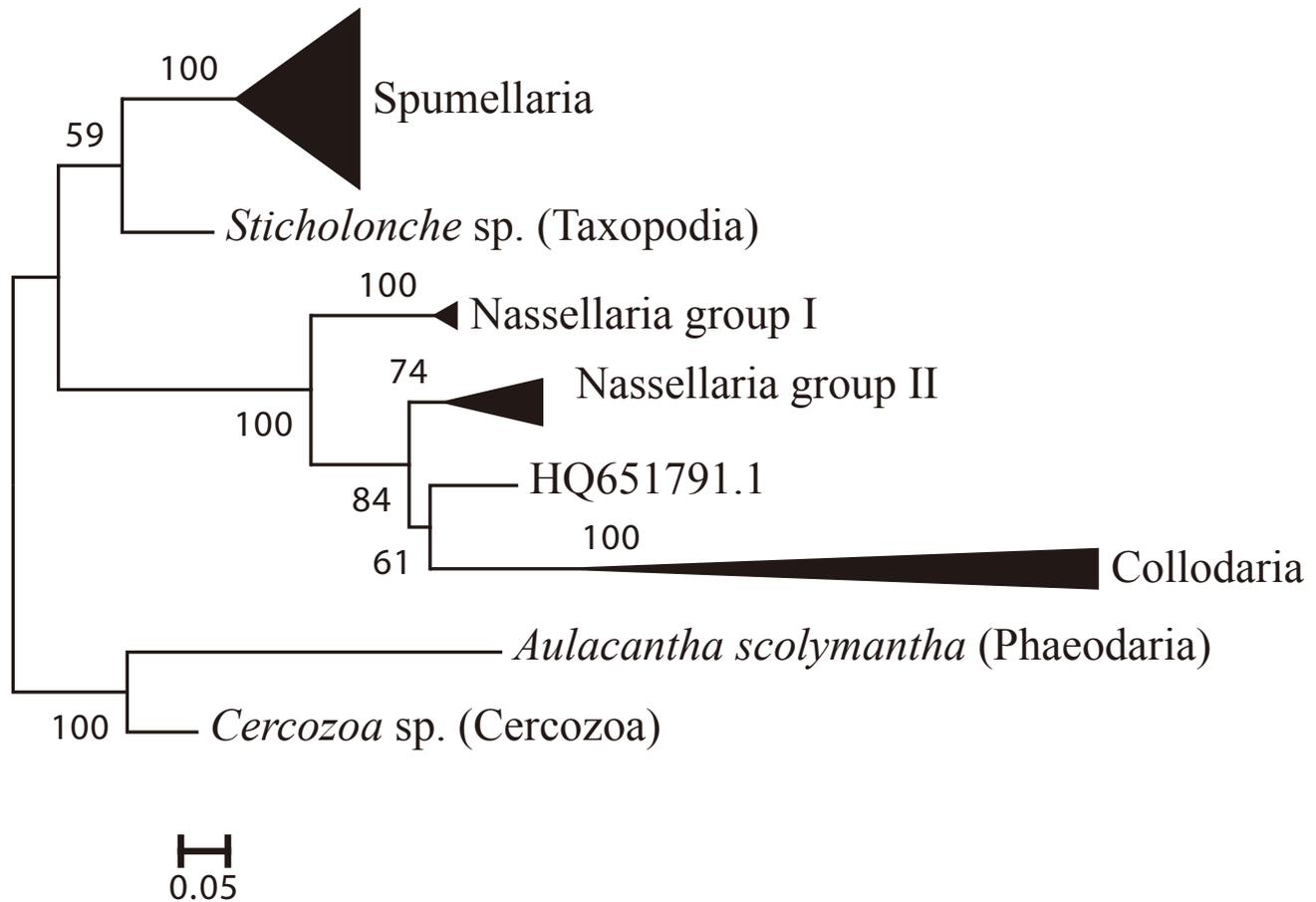


図2. 18S rRNAを用いた放散虫全体の分子系統樹. 分子系統推定として最尤法 (Maximum likelihood method ; ML法) を用いている. 各分岐の値は, ブートストラップ確率 (bootstrap values) と呼ばれる各分岐の確からしさを示す値である.

Suzuki and Aita, 2011; Suzuki and Not, 2015). 骨格構造からはエンタクチナリア目 (Entactinaria) が現生種にいとされている (De Wever *et al.*, 2001) が, 遺伝子解析では識別されていないので本稿では議論から除外する. なお, コロダリア目をスプメラリア目の一部だとしている論文が今でも見受けられるので「スプメラリア目」が何を具体的に指しているのか注意が必要である. この現生3目のうち, スプメラリア目とナセラリア目+コロダリア目では, 遺伝子の挿入欠失 (indel) により大きく配列が異なることが今回分かったので, それぞれの解析の精度を上げるために別々に系統樹を作成した (ナセラリア目+コロダリア目の系統樹: 図3, スプメラリア目の系統樹: 図4). 黒丸 (●) は共生藻類を持つ種, 白抜き三角 (▽) は共生藻類を持たない種を示す. 印がないのは有無が不明の種である. 共生藻類の有無は文献データと著者らの観察結果にもとづいて設定した. さて, スプメラリア目とコロダリア目は単系統 (事後確率=100) であるものの, ナセラリア目はコロダリア目の側系統であることが分かる. 単系統とは「単一の共通祖先に由来する全ての分類群の集合」で, 側系統とは「単一の共通祖

先に由来する全ての分類群 (単系統) からそれに含まれる一つあるいはいくつかの単系統群が抜けた分類群」のことを指す. 図3において, コロダリア目は一つの共通祖先 (*印) を持ちその共通祖先に由来する全ての分類群を含むので単系統である. 一方のナセラリア目の共通祖先 (#) は, コロダリア目の共通祖先でもあるので, 単系統ではなく, 側系統と解釈できる. Petrushevskaya (1984) は, 形態的にスプメラリア目からコロダリアを分離し目として提唱した. その分子系統解析による側系統性については, Yuasa *et al.* (2005) が初めて指摘している. 一般に分子系統解析において, 一つの分類群が異なる共通祖先からなる多系統である場合, その分類群の正当性が失われ, 複数の単系統の分類群に分離される根拠となる. ただし, 側系統であるからといって機械的に分類名を独立させていくことは実用上に問題を生じるので, 側系統を分類群として認めるかどうかについては研究者によって意見が異なっている. たとえば, 自然界の高次系統では, 爬虫類や双子葉植物など, 一般に親しまれている分類群の多くが側系統群であることが分かってきた. この側系統性を, 化石記録に立ち返って検証して

も証明することは極めて困難であった。

話がそれだが、コロダリア目のほとんどの種は共生藻類を持ち、ナセラリア目は共生藻類を持つ割合が低い（2種）がそれぞれ別々のクレードに出現した。コロダリア目は従来から言われているとおり（Suzuki and Aita, 2011; Biard *et al.*, 2015）である。ナセラリア目では種によって共生藻類が居たり居なかったりすることは知られている（松岡, 1993; Sugiyama and Anderson, 1997b; Ogane *et al.*, 2010）が、ホストの系統樹での位置づけはこれまであまり着目されていなかった。スプメラリア目は化石に基づく形態進化系統の検討が進んでいない（De Wever *et al.*, 2001; Suzuki and Not, 2015）。属・科レベルでの分類も試行錯誤が続いている状況にあるが、超科レベルでまとめると系統樹と形態分類の関係が比較的整合的にまとまる（Matsuzaki *et al.*, 2015; Suzuki and Not, 2015）。

図4において、白丸（○）は共生藻類を持つと考えられるが未確定の種である。Spongodiscidae科+Coccodiscidae科のクレードはその多くが共生藻類を持つが、*Spongodiscus resurgens*のようにクレードの中でも共生藻類を持たない種も存在する。また、図4の下部のクレードはほとんど共生藻類を持たない種からなるが、*Tetrapyle octacantha*の様に共生藻類を持つ種も見られた。

放散虫では“*Brandtonidium*” *nutricula*という渦鞭毛藻類の単独種がコロダリア目、ナセラリア目、スプメラリア目と共生するとされる（Probert *et al.*, 2014）。放散虫が共生藻類を持つ進化イベントが複数回起こったか、放散虫自身にもともと共生藻類を持つ能力があり生活環境によって持ったり持たなかったり出来るという2つの仮説が考えられるが、放散虫の姉妹群である有孔虫でも共生藻類が存在することから（Decelle *et al.*, 2015; Kimoto,

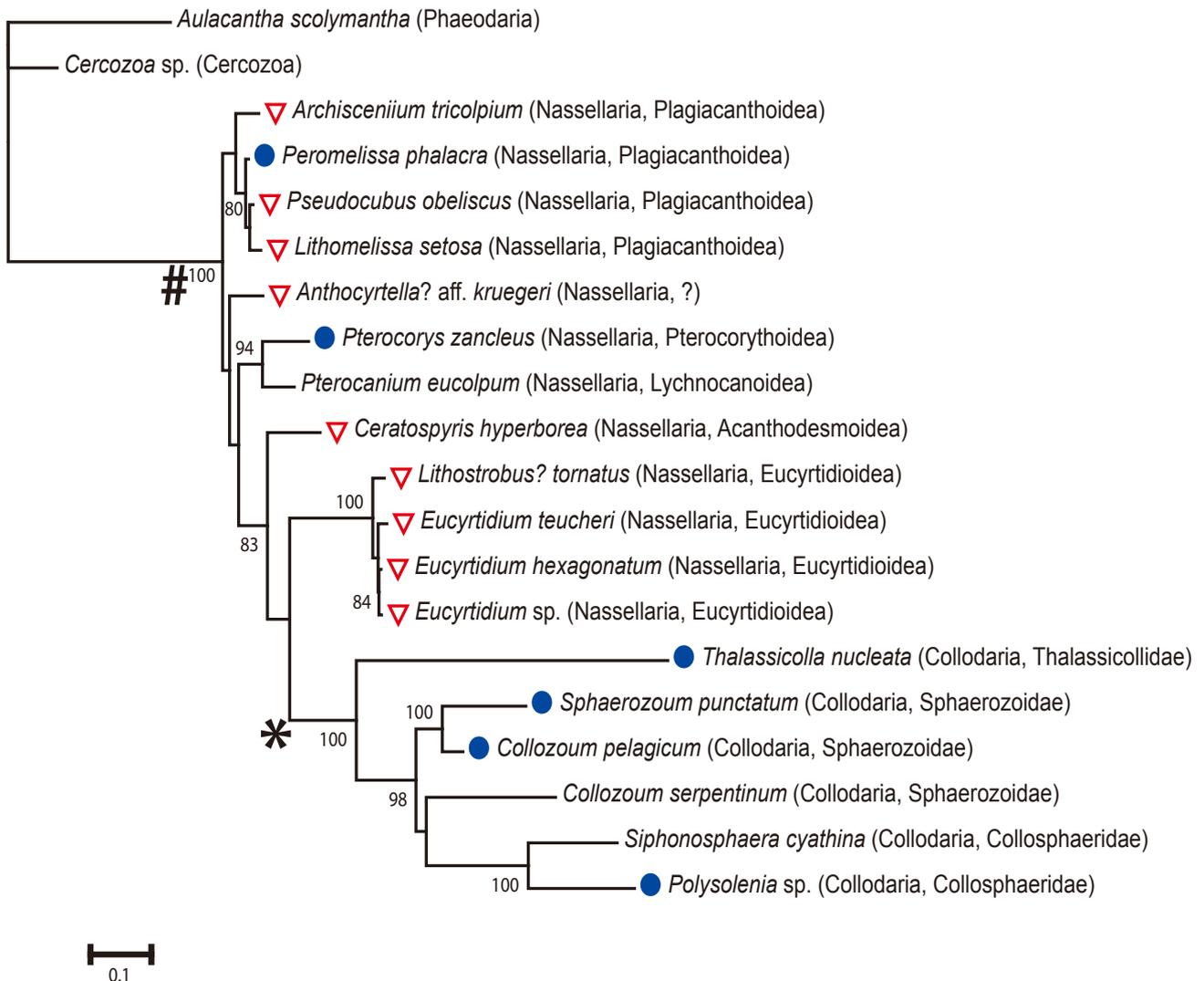


図3. 共生藻類の有無と放散虫の系統関係. ナセラリア目とコロダリア目の18S rRNAを用いた分子系統樹. ●: 共生藻類を保有, ▽: 共生藻類を保有しない. ML法による. 各分岐の値はブートストラップ確率. 科と超科 (-oideaの語尾をもつ学名)はMatsuzaki *et al.* (2015)とSuzuki and Not (2015)による.

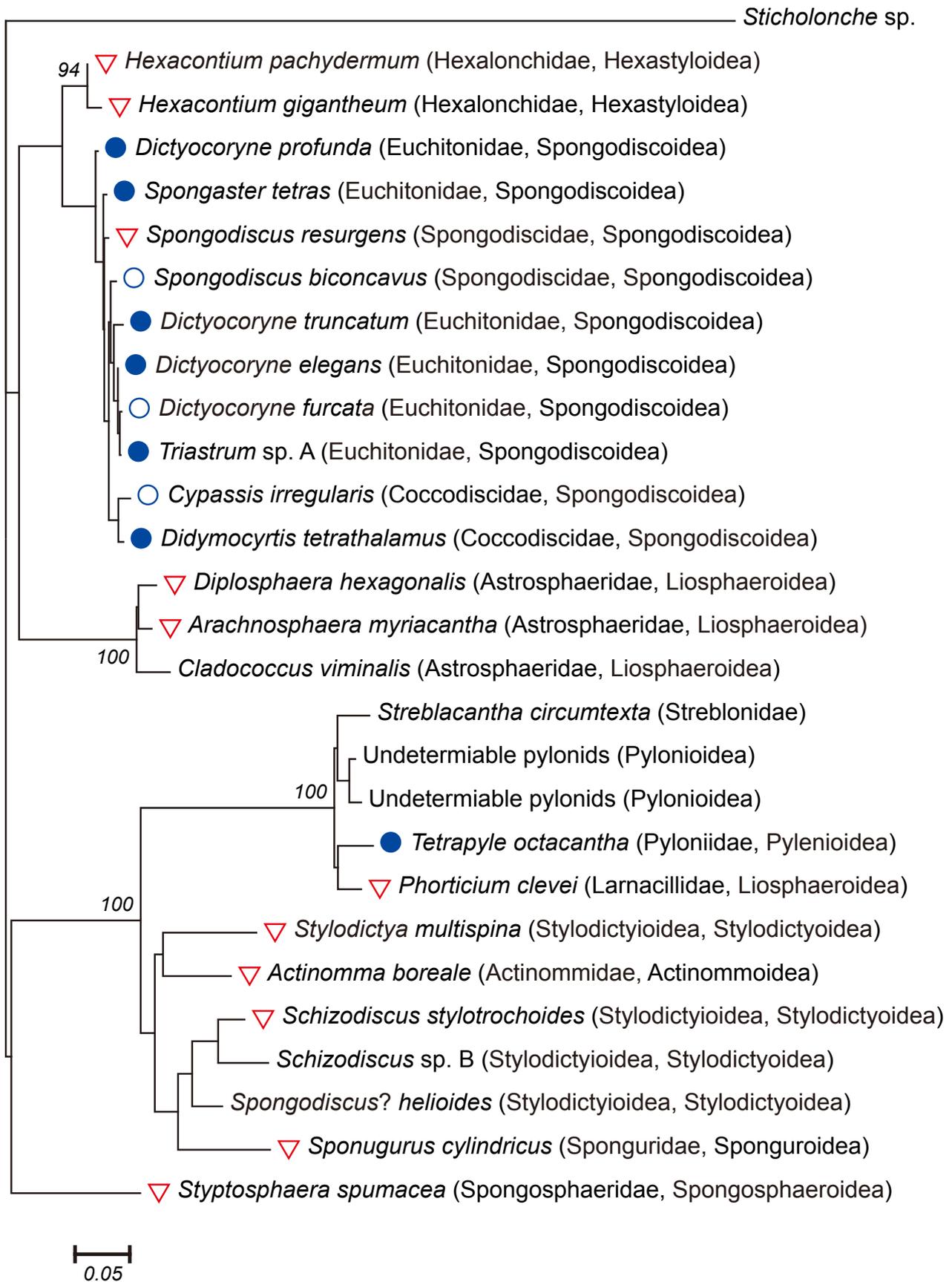


図4. スブメラリア目の18S rDNAを用いた分子系統樹。●：共生藻類を保有，○：共生藻類を持つと考えられるが未確定，▽：共生藻類を保有しない。ML法。各分岐の値はブートストラップ確率。科と超科（-oideaの語尾をもつ学名）はMatsuzaki *et al.* (2015) と Suzuki and Not (2015) による。

2015), 放散虫自体が基本的に共生藻類を持つ能力を祖先種の段階から備えており, 環境に適応して共生藻類を持ったり持たなかったりしている可能性が高いと考えられる. また, コロダリア目, スプメラリア目の Spongodiscidae 科 + Coccodiscidae 科の様な共生藻類を持つ割合の高いグループは, 貧栄養海域の浅海などそれらの生息環境が反映した結果であると考えられる.

放散虫の生活環と共生藻類の獲得

放散虫の生活環はよく分かっていない (大金, 2013). これは, 放散虫が再生産するに至る培養が技術的に確立されていないことに原因がある. 大金 (2013) は様々な工夫を行い, 幼体と思われる小型個体を成体と考えられる大きさまで培養することに成功しているが, その成功率は低く安定していない. 世界的にも Anderson *et al.* (1989), Matsuoka and Anderson (1992), Sugiyama and Anderson (1997a) らが生長の観察を行っているが, いずれも体サイズの増加が見られたに過ぎず, 有性・無性を問わず生殖の観察には成功していない. 私たちは南太平洋で殻形成の初期の放散虫個体を多く観察しているが, 多くは共生藻類を既に保有していた (図5). 放散虫が他の多くの原生生物のように二分裂や接合によって無性・有性生殖を行うのであれば, 共生藻類はホストの生殖と同時に娘細胞にも分割されるのかもしれない. そうでないならば, 細胞密度が極めて低い貧栄養の水域でホストと共生藻類が会うのは難しいのではないかと考えられる. 現在の所, ホストである放散虫の生活環自体が不明

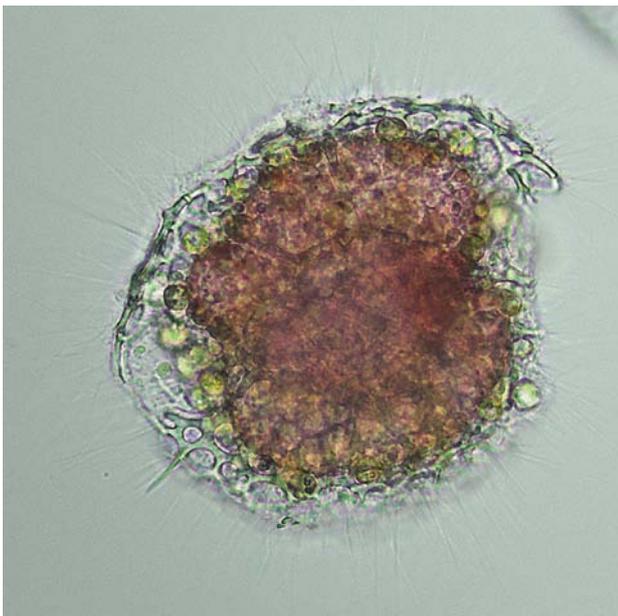


図5. 殻形成途上の放散虫 (スプメラリア目) と共生藻類. コッコイド・フォーム (coccoid form) をしている黄褐色の共生藻類が放散虫の珪質骨格の“内側”に収まっている. 放散虫を包む透明な部分は外囊 (extracapsulum) と呼ばれる細胞質.

のため, 共生藻類の挙動もすべて推測の域を出ない.

まとめ

本稿では放散虫の共生藻類を題材に, ジーンバンクの分類名を最新に更新して検討する意義を述べてきた. 分類名というものが研究者の考え方や分類学の進展により変わり得るものである事, そしてその事を考慮して解析する事の大切さが伝われば幸いである. 栄養のやりとりを中心とした生物間の共生は様々な生物で行われる. 私たちが参加している国立科学博物館の共生系に関する総合研究では, 様々な共生系についての研究を行っている. 海洋域の共生研究は, チームによる共同研究により, 水域の栄養塩・一次生産者のクロロフィル濃度・水温や塩分濃度などの環境に関するパラメータの入手が容易であり, 生物の共生を環境要因と関連づけて研究するフィールドとしては極めて優れている. この様な研究は同時に, 個々の生物種の環境特性を解釈する手段を将来的に提供する事が可能になり, 放散虫化石を用いた古環境解析に新たな展開をもたらす可能性を秘めているのかもしれない.

謝辞

本稿のもととなる基礎データの収集には, 琉球大学熱帯生物圏研究センター・瀬底研究施設, 広島大学水産学部付属練習船「豊潮丸」, 北海道大学大学院水産科学院付属練習船「おしよろ丸」, 三重大学水産学部付属練習船「勢水丸」, 水産総合研究センター東北区水産研究所「若鷹丸」などを利用させていただいたり, 試料採集をしていただいたもので, 数十人の方々の協力があったなしえた事です. 列挙できませんがこれまでの協力者に厚く御礼申し上げます. また, 本稿は科学技術振興機構 戦略的国際科学的技術協力事業 (日本-フランス (CNRS) 研究交流)「環境・進化・地質学的に重要な海洋プランクトン (放散虫) の形態-分子の多様性モニタリング」(代表: 鈴木紀毅, 平成23~26年度) および国立博物館・総合研究「生物の相互関係が創る生物多様性の解明」の成果を含む. 最後に本稿を査読した匿名2名のご指摘で本原稿は大きく改善されました.

文献

- Anderson, O.R., Bennett, P. and Bryan, M., 1989. Experimental and observational studies of radiolarian physiological ecology: 3. Effects of temperature, salinity and light intensity on the growth and survival of *Spongaster tetras tetras* maintained in laboratory culture. *Marine Micropaleontology*, **14**, 275-282.
- Anderson, O.R., Swanberg, N. R. and Bennett, P., 1985. Laboratory studies of the ecological significance of host-algal nutritional

- associations in solitary and colonial Radiolaria. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **65**, 263–272.
- Biard T., Pillet, L., Decelle, J., Poirier, C., Suzuki, N. and Not, F., 2015. Towards an integrative morpho-molecular classification of the Collodaria (Polycystinea, Radiolaria). *Protist*, **166**, 374–388.
- Blank, R.J., 1986. Nomenclature of endsymbiotic dinoflagellates. *Taxon*, **35**, 286–294.
- Brandt, K., 1881a. Über das Zusammenleben von Thieren und Algen. *Archiv für Anatomie und Physiologie*, **1881**, 570–574.
- Brandt, K., 1881b. Über das Zusammenleben von Algen und Tieren. *Biologisches Zentralblatt*, **1**, 524–527.
- Compère, P., 1999. Report of the committee for algae:6. *Taxon*, **48**, 811–814.
- De Wever, P., Dumitrica, P., Caulet, J.-P., Nigrini, C. and Caridroit, M., 2001. *Radiolarians in the Sedimentary Record*. 533p., Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.
- Decelle, J., 2013. New perspectives on the functioning and evolution of photosymbiosis in plankton. Mutualism or parasitism? *Communicative & Integrative Biology*, **6**, e24560.
- Decelle, J., Colin, S. and Foster, R.A., 2015. Photosymbiosis in marine planktonic protists. In Ohtsuka, S., Suzuki, T., Horituchi, T., Suzuki, N. and Not, F., eds., *Marine Protists: Diversity and Dynamics*, 465–500. Springer, Tokyo.
- Decelle, J., Probert, I., Bittner, L., Desdevises, Y., Colin, S., de Vargas, C., Gali, M., Simó, R. and Not, F., 2012a. An original mode of symbiosis in open ocean plankton. *PNAS*, **109**, 18000–18005.
- Decelle, J., Siano, R., Probert, I., Poirier, C. and Not, F., 2012b. Multiple microalgal partners in symbiosis with the acantharian *Acanthochiasma* sp. (Radiolaria). *Symbiosis*, **57**, 233–244.
- Decelle, J., Suzuki, N., Mahé, F., de Vargas, C. and Not, F., 2012c. Molecular phylogeny and morphological evolution of the Acantharia (Radiolaria). *Protist*, **163**, p. 435–450.
- Decelle, J., Martin, P., Paborstava, K., Pond, D.W., Tarling, G., Mahé, F., de Vargas, C., Lampitt, R. and Fabrice, N., 2013. Diversity, ecology and biogeochemistry of cyst-forming Acantharia (Radiolaria) in the oceans. *PLOS One*, **8**, e53598.
- Dolven, J.K., Lindqvist, C., Albert, V.A., Bjørklund, K.R., Yuasa, T., Takahashi, O. and Mayama, S., 2007. Molecular diversity of alveolates associated with neritic North Atlantic radiolarians. *Protist*, **158**, 65–76.
- Fawcowski, P.G. and Knoll, A.H., 2007. *Evolution of Primary Producers in the Sea*. 441p., Elsevier, Amsterdam.
- Greuter, W., McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Filgueiras, T.S., Nicolson, D.H., Silva, P.C., Skog, J.E., Trehane, P., Turland, N.J. and Hawksworth, D.L. eds., 2000. *International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code): Adopted by the Sixteenth International Botanical Congress St. Louis, Missouri, July–August 1999, Regnum Vegetabile Series Volume 138*, 474p., Koeltz, Königstein.
- Ishitani, Y., Ujiie, Y., de Vargas, C., Not, F. and Takahashi, K., 2012. Two distinctive lineages in the radiolarian Order Spumellaria having different ecological preference. *Deep Sea Research II: Topical Studies in Oceanography*, **61–64**, 172–178.
- 石田祐三郎, 2007. 海洋微生物と共生：サンゴ礁・海底熱水孔の生き物たち. 170p., 青山堂書店, 東京.
- 石橋信義・名和行文, 2008. 寄生と共生. 300p., 東海大学出版会, 泰野.
- 木原 章・Travaglini, A.・Bentivegna, F., 2016. ナポリ臨海実験所標本データベースの分類データベースとしての役割. 化石, **99**, 33–46.
- Kimoto, K., 2015. Planktonic foraminifera. In Ohtsuka, S., Suzuki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N. and Not, F., eds., *Marine Protists: Diversity and Dynamics*, 129–178. Springer, Tokyo.
- Kunitomo, Y., Sarashina, I., Iijima, M., Endo, K. and Sashida, K., 2006. Molecular phylogeny of acantharian and polycystine radiolarians based on ribosomal DNA sequences, and some comparisons with data from the fossil record. *European Journal of Protistology*, **43**, 143–153.
- 松岡 篤, 1993. 沖縄瀬底島周辺海域の現生放散虫. 化石, **54**, 1–9.
- 松岡 篤, 2002. 現生放散虫研究の手法と研究機器. 化石, **71**, 19–27.
- Matsuoka, A., 2007. Living radiolarian feeding mechanisms: new light on past marine ecosystems. *Swiss Journal of Geosciences*, **100**, 273–279.
- Matsuoka, A. and Anderson, O.R., 1992. Experimental and observational studies of radiolarian physiological ecology: 5. Temperature and salinity tolerance of *Dicthyocoryne truncatum*. *Marine Micropaleontology*, **19**, 299–313.
- Matsuzaki, K.M., Suzuki, N. and Nishi, H., 2015. Middle to Upper Pleistocene polycystine radiolarians from Hole 902-C9001C, northwestern Pacific. *Paleontological Research, supplement*, **19**, 1–77.
- Muscantine, L., Falkowski, P.G., Porter, J.W. and Dubinsky, Z., 1984. Fate of photosynthetic fixed carbon in light- and shade-adapted colonies of the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **222**, 181–202.
- Nakamura, Y., Imai, I., Yamaguchi, A., Tuji, A., Not, F. and Suzuki, N., 2015a. Molecular phylogeny of the widely distributed marine protists, Phaeodaria (Rhizaria, Cercozoa). *Protist*, **166**, 366–373.
- Nakamura, Y., Imai, I., Tuji, A. and Suzuki, N., 2015b. A new phaeodarian species discovered from the Japan Sea Proper Water, *Auloscaena pleuroclada* sp. nov. (Aulosphaeridae, Phaeosphaerida, Phaeodaria). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. Early View.
- OED, 2009. *Oxford English Dictionary Second Edition on CD-ROM (v. 4.0)*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- 大金 薫, 2013. 放散虫（ポリキスティナ）の生細胞観察と培養実験から得られた知見と問題点. 原生動物学雑誌, **46**, 5–19.
- Ogane, K., Tuji, A., Suzuki, N., Matsuoka, A., Kurihara, T. and Hori, R.S., 2010. Direct observation of the skeletal growth patterns of polycystine radiolarians using a fluorescent marker. *Marine Micropaleontology*, **77**, 137–144.
- Ogane, K., Tuji, A., Suzuki, N., Kurihara, T. and Matsuoka, A., 2009. First application of PDMPO to examine silicification in polycystine radiolaria. *Plankton & Benthos Research*, **4**, 89–94.
- Ogane, K., Tuji, A., Suzuki, N., Matsuoka, A., Kurihara, T. and Hori, R.S., 2010. Direct observation of the skeletal growth patterns of polycystine radiolarians using a fluorescent marker. *Marine Micropaleontology*, **77**, 137–144.
- Petrushevskaya, M.G., 1967. Radiolarian orders Spumellaria and Nassellaria in the Antarctic regions (materials by Soviet Antarctic expeditions). *Issledovaniya Fauny Morei*, **4**, 5–186. (in Russian; original title translated)
- Petrushevskaya, M.G., 1984. On the classification of Polycystine radiolarians. In Petrushevskaya, M.G. and Stepanyants, S.D. eds., *Morfologiya, Ekologiya i Evolyutsiya Radiolyariy*, 124–148. Nauka, Leningrad. (in Russian with English abstract)
- Probert, I., Siano, R., Poirier, C., Decelle, J., Biard, T., Tuji, A., Suzuki, N. and Not, F., 2014. *Brandtodinium* gen. nov. and *B. nutricula* comb. nov. (Dinophyceae), a dinoflagellate commonly found in symbiosis with polycystine radiolarians. *Journal of Phycology*, **50**, 388–399.
- Rost, F.W.D., 1995. *Fluorescence Microscopy, Volume 2*. 457p., Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Silva, P.C., 1994. Report of the Committee for Algae: 2. *Taxon*, **43**, 257–264.
- Silva, P.C., 1999. (1379) Proposal to conserve the name *Chlorella* against *Zoochlorella* (*Chlorophyceae*). *Taxon*, **48**, 135–136.
- Sugiyama, K. and Anderson, O.R., 1997a. Experimental and

- observational studies of radiolarian physiological ecology, 6. Effects of silicate-supplemented seawater on the longevity and weight gain of spongoise radiolarians *Spongaster tetras* and *Dictyocoryne truncatum*. *Marine Micropaleontology*, **29**, 159–172.
- Sugiyama, K. and Anderson, O.R., 1997b. Correlated fine structural and light microscopic analyses of living nassellarians *Eucyrtidium hexagonatum* Haeckel, *Pterocorys zancleus* (Müller) and *Spirocyrtis scalaris* Haeckel. *News of Osaka Micropaleontologists, Special Volume*, **10**, 311–337.
- 鈴木紀毅, 2016. シノニム・データベース PaleoTax for Windows に基づく放散虫研究の現状. 化石, **99**, 15–31.
- Suzuki, N. and Aita, Y., 2011. Radiolaria: Achievement and unsolved issues on radiolarian studies: Taxonomy and cytology. *Plankton and Benthos Research*, **6**, 69–91.
- Suzuki, N. and Not, F., 2015. Biology and ecology of Radiolaria. In Ohtsuka, S., Suzaki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N. and Not, F., eds., *Marine Protists: Diversity and Dynamics*, 179–222. Springer, Tokyo.
- Suzuki, N., Ogane, K., Aita, Y., Kato, M., Sakai, S., Kurihara, T., Matsuoka, A., Ohtsuka, S., Go, A., Nakaguchi, K., Yamaguchi, S., Takahashi, T. and Tuji, A., 2009. Distribution patterns of the radiolarian nuclei and symbionts using DAPI-fluorescence. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B (Botany)*, **35**, 169–182.
- Takahashi, O., Mayama, S. and Matsuoka, A., 2003. Host-symbiont associations of polycystine Radiolaria: Epifluorescence microscopic observation of living Radiolaria. *Marine Micropaleontology*, **49**, 187–194.
- Tuji, A., Mohri, Y., Ki, J.-S., Jung, S.-W. and Julius, M.L., 2014. Phylogeny of *Praestephanos* gen. nov. (Thalassiosirales, Bacillariophyceae) based on *Stephanodiscus suzukii*, and related freshwater thalassiosiroid diatoms. *Plankton and Benthos Research*, **9**, 132–140.
- Tuji, A. and Niiyama, Y., 2010. Phylogenetic study by the morphological and molecular analyses of Japanese planktonic *Anabaena* species. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B (Botany)*, **36**, 71–80.
- Tuji, A. and Niiyama, Y., 2012. Three new combinations of Japanese planktonic cyanobacteria species. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B (Botany)*, **38**, 37–38.
- Uhle, M.E., Macko, S.A., Spero, H.J., Lea, D.W., Ruddiman, W.F. and Engel, M.H., 1999. The fate of nitrogen in the *Orbulina universa* foraminifera-symbiont system determined by nitrogen isotope analyses of shell-bound organic matter. *Limnology and Oceanography*, **44**, 1968–1977.
- 湯浅智子, 2012. 地質時代を生き延びた放散虫の生存戦略: 放散虫と藻類の共生. 生物の科学「遺伝」, **7**, 398–403.
- Yuasa, T., Takahashi, O., Honda, D. and Mayama, S., 2005. Phylogenetic analyses of the polycystine Radiolaria based on the 18s rDNA sequences of the Spumellarida and the Nassellarida. *European Journal of Protistology*, **41**, 287–298.

(2015年9月10日受付, 2015年12月15日受理)

